Aus der Kinderklinik der Freien Universität Berlin
Kaiserin Auguste Victoria Haus
Direktor: Prof. Dr. med. H. HELGE

Induziert Riboflavin während der Phototherapie bei der ikterischen Gunn-Ratte phototoxische Reaktionen?

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

1978

vorgelegt von
ARIES BUNJAMIN
aus Djakarta/Indonesien

Aus der Kinderklinik der Freien Universität Berlin
Kaiserin Auguste Victoria Haus
Direktor: Prof. Dr. med. H. HELGE

Induziert Riboflavin während der Phototherapie bei der ikterischen Gunn - Ratte phototoxische Reaktionen ?

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
ARIES BUNJAMIN
aus Djakarta / Indonesien

Referent: Prof. Dr. med. L. BALLOWITZ

Korreferent: Prof. Dr. E. SCHWARZ

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 6. Februar 1978

Meinen Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

INHALTÜBERSICHT

Seite

EINLEITUNG 5

MATERIAL UND METHODE 9

ERGEBNISSE

A. ERGEBNISSE DER HISTOLOGISCHEN UNTERSUCHUNGEN DER HAUPTVERSUCHE.. 16

B. GEWICHTSVERHALTEN 20

C. DICKE DES FELLS 23

D. SERUM BILIRUBIN UND HÄMATOKRIT ... 26

E. ERGEBNISSE DER HISTOCHEMISCHEN UNTERSUCHUNGEN DES KLEINHIRNS 30

DISKUSSION 35

ZUSAMMENFASSUNG 42

LITERATURVERZEICHNIS 44

EINLEITUNG:

Auf Grund der Kenntnis der Lichtempfindlichkeit des Bilirubins wiesen 1958 CREMER und Mitarbeiter darauf hin, daß die Bilirubinkonzentration im Serum von Neugeborenen durch Bestrahlung mit Licht herabgesetzt werden kann. Sie verwendeten für die Bestrahlung sowohl Sonnenlicht, als auch künstliches Licht.

Die Wirkung basiert auf der Eigenschaft des Bilirubins, Licht zu absorbieren. Die absorbierten Lichtquanten induzieren eine photochemische Reaktion. In Anwesenheit von O2 zerfällt Bilirubin durch Photooxydation in wasserlösliche Spaltprodukte.

Untersuchungen verschiedener Autoren (BALLOWITZ et al; HAMPEL) haben ergeben, daß die Geschwindigkeit des Abfalls des Serumbilirubins von der Bestrahlungsstärke und der Wellenlänge des verwendeten Lichtes abhängt.

Der blaue Bereich des Spektrums (42o - 48o nm) ist am wirksamsten. (Das Absorptionsmaximum des Bilirubins liegt zwischen 45o - 46o nm). Grünes und violettes Licht haben einen deutlich geringeren Effekt. Bei Bestrahlung mit weißem Licht ist der darin enthaltene Anteil blauer Strahlen ausschlaggebend.

KOSTENBAUDER und Mitarbeiter haben bei in vivo Versuchen an Gunn-Ratten nachgewiesen, daß der Abbau des Bilirubins unter Bestrahlung durch gleichzeitig verabreichtes Riboflavin verstärkt wird. Die Autoren bestrahlten die mit 75 mg/kg Riboflavin-phosphat behandelten Tiere mit weißem und blauem Licht. Nur bei den weiß bestrahlten Tieren, die relativ wenig von den für den Bilirubinabbau notwendigen blauen Strahlen erhielten, war die Beschleunigung

durch Riboflavin nachweisbar.

Alle Versuchstiere, die mit blauem Licht bestrahlt wurden, zeigten einen rascheren Abfall des Bilirubins. Bei ihnen ergab sich jedoch kein markanter Unterschied zwischen mit Riboflavin behandelten Tieren und Kontrolltieren, die nur bestrahlt wurden.

Riboflavin absorbiert ebenfalls Licht. Die dabei aufgenommene Energie versetzt es in einen angeregten (triplett) Zustand. Das angeregte Molekül gibt Energie an Sauerstoff ab, woraufhin dieser in den angeregten Zustand (Singulett - Sauerstoff) übergeht (PASCALE et al).

Die Photooxydation von Bilirubin vollzieht sich beschleunigt in Gegenwart von O_2 im Singulett-Zustand, beziehungsweise kommt es zu einer Limitierung, wenn kein O_2 mehr vorhanden ist.

In der Kinderklinik der Freien Universität Berlin bestrahlte WIRJADI Gunn-Ratten mit blauem (Westinghouse F 20 T 12 / BB) und weißem Licht (Osram L20 W/19) und injizierte unmittelbar vor Beginn der Bestrahlung verschiedene Dosen von Riboflavin-5'-phosphat Natrium (Ribofl.-5'-p Na). Er konnte eine dosisabhängige Beeinflussung durch Riboflavin klar herausstellen. Abweichend von den Ergebnissen von KOSTENBAUDER und Mitarbeitern war diese Wirkung nicht nur bei schwacher (weißer), sondern auch bei intensiver (blauer) Bestrahlung nachweißbar.

Der prozentuale Abfall der Serumbilirubinkonzentration in einer gegebenen Zeit vergrößerte sich sowohl mit der Riboflavindosis, als auch mit der effektiven Bestrahlungsstärke. LIETZ stellte in daran anschließenden Versuchen fest, daß eine intraperitoneale Riboflavin-Appli-

kation den gleichen Effekt hat wie die subcutane.

Orale und cutane Verabreichung zeigt jedoch keine sichere Wirkung.

Bei den Versuchen von WIRJADI und LIETZ hatten auffallenderweise die Tiere, deren Serumbilirubinkonzentration durch hohe Riboflavin-5'-p Na Gabe und hohe Bestrahlungsintensität am stärksten abgesunken war, keine besseren Überlebenschancen als Kontrolltiere. Im Gegenteil: Bei den höchsten Dosen kam es vorwiegend bei blaubestrahlten, nicht bei im Dunkeln gehaltenen Tieren zu mangelnder Gewichtszunahme und erhöhter Letalität.

Hautveränderungen wurden makroskopisch nicht beobachtet.

Natives Riboflavin ist praktisch atoxisch. K. LANG hat aber darauf hingewiesen, daß durch geringe Änderungen am Molekül, z.B. Fortfall der Methylgruppen in Stellung 6 und 7, stark toxische Substanzen entstehen können. Diese sollen Atemlähmungen bewirken.

Riboflavin ist eine photosensibilisierende Substanz. Eine solche kann durch photodynamische, bzw. photochemische Umsetzungen phototoxische und photoallergische Reaktionen erzeugen. Voraussetzung ist, daß der photodynamisch wirksame Sensibilisator (Riboflavin) und Licht gleichzeitig anwesend sind (HANS STORK).

Ich will mit meinen Untersuchungen der Frage nachgehen, ob nach subcutaner Injektion von Riboflavin bei homozygoten, ikterischen Gunn-Ratten in Gegenwart von Bilirubin eine phototoxische Reaktion auftritt.

Da für eine ausreichende Senkung der Plasmabilirubin-

konzentration ikterischer Früh- und Neugeborener bei Verwendung von Leuchtstofflampen in der Regel mehrere Tage Phototherapie erforderlich sind, könnte es durchaus wünschenswert erscheinen, den Abbau des Bilirubins durch Koppelung an einen anderen photobiologischen Prozeß zu beschleunigen. Es dürfte nach den bisher vorliegenden Beobachtungen mit Riboflavin möglich sein, die Dauer und eventuell auch die Intensität der Bestrahlung zu reduzieren.

Eine klinische Anwendung käme aber nur in Betracht, wenn damit keine zusätzlichen Gefahrenmomente entstehen.

MATERIAL UND METHODE:

Als Versuchstiere dienten Gunn-Ratten, die einen rezessiv vererblichen Mangel der Glucuronyl-Transferase-Aktivität in der Leber aufweisen. Dieses Enzym koppelt Bilirubin mit UDP-Glucuronsäure. Es entstehen Bilirubinmono- und diglucuronide. Die homozygoten Gunn-Ratten weisen zeitlebens hohe Serumbilirubinkonzentrationen auf. Bei den meisten homozygoten Tieren entwickelt sich eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Bilirubinenzephalopathie (ein sog. Kernikterus). Bei den heterozygoten Tieren sind die Bilirubinwerte im Serum normal. Ganglienzellschäden treten in der Regel nicht auf.

Für die Versuche wurden 3 - 5 Tage alte homo- und heterozygote Gunn-Ratten mit einem Gewicht von 7 - 11 g verwendet. Während eines Versuches wurden vier, maximal sieben Junge von einer Rattenmutter gesäugt. Die Jungen wurden bei dem Kurzversuch 24 Stunden lang in lichtdurchlässigen Makrolonkäfigen ohne Einstreu zusammen mit je einer laktierenden Rattenmutter gehalten. Aus pflegerischen Gründen wurden die Tiere bei den Langzeitversuchen vom zweiten Tag an in den gleichen Makrolonkäfigen mit etwas Einstreu gehalten. Damit mußte von unten ein Bestrahlungsverlust von 1/3 bis 1/2 in Kauf genommen werden.

Eine Gruppe von Tieren wurde mit blauem, die andere mit weißem Licht bestrahlt und die dritte Gruppe bei gleicher Umgebungstemperatur im Dunkeln gehalten. Bestrahlt wurde von oben und von unten.

Wir verwendeten als Lichtquelle 12 Leuchtstofflampen (je 6 von oben und 6 von unten). Der Abstand zwischen den

Lampen und em Käfigboden betrug ca. 3o cm.

Blaue Bestrahlung wurde mit Westinghouse F 20 T 12 BB special blue erzielt.

Mit dem von BALLOWITZ, GEUTLER, KROCHMANN und Mitarbeitern entwickelten Spezial-Radiometer wurde eine für den Bilirubinabbau effektive Bestrahlungsstärke E_{bili} von ca. 3,0 mW/cm^2 eingestellt.

Für die weiße Bestrahlung benutzten wir Osram L 2o W/19 daylight E_{bili} ca. o,3 mW/cm^2.

Die Kontrolltiere im Dunkeln befanden sich oberhalb der Bestrahlungsregale in einem abgedunkelten Areal.
Zwei Versuchsreihen wurden durchgeführt:

A. Kurzversuche, die 24 Stunden dauerten,
B. Langzeitversuche. Diese Tiere erhielten mehrmals jeweils im Abstand von 48 Stunden Ribofl.-5'-p Na, bzw. physiolog. NaCl Lösung s.c.

Die Versuchsreihe A umfaßt 5 Gruppen mit 84 (3-5 Tage alten) homo- und heterozygoten Gunn-Ratten.

1. erhielten 31 homozygote Tiere 200 mg/kg Ribofl.-5'-p Na s.c. in die Rückenhaut injiziert.
   11 Junge wurden 24 Stunden mit blauem, 10 Junge mit weißem Licht bestrahlt und 10 im Dunkeln gehalten.
2. erhielten 15 heterozygote Gunn-Ratten 200 mg/kg Ribofl.-5'-p Na s.c. Je 5 Tiere wurden mit blauem und weißem Licht bestrahlt und 5 in den Dunkelraum gesetzt.

3. wurde das gleiche Volumen physiologische NaCl-Lösung 15 homozygoten Tieren s.c. am Rücken injiziert. Auch diese Tiere wurden in gleicher Weise bestrahlt bzw. im Dunkeln gehalten.

4. erhielten 5 homozygote Ratten 50 mg/kg Ribofl.-5'-p Na s.c. Alle wurden blau bestrahlt.

5. erhielten 18 homozygote Tiere in vitro bestrahltes Ribofl.-5'-p Na s.c., 9 Tiere wurden blau bestrahlt und 9 Tiere bleiben im Dunkeln.

Für die Bestrahlung in vitro wurden 50 mg Ribofl.-5'-p Na primär in 30 ml Aquadest gelöst und in einem offenen Erlenmeyer Kölbchen 3 Tage lang mit blauem Licht bestrahlt. Die Erlenmeyer Kölbchen standen in unserem Bestrahlungsregal unten direkt auf einer Leuchtstofflampe. In der Lösung entstand eine Temperatur von etwa 50°C. Die anfangs stark gelbe Lösung blaßte im Laufe der Bestrahlung ab. Das Wasser verdunstete weitgehend. Nach drei Tagen wurde der fast farblose Rückstand in 5 ml Aquadest aufgenommen. Diese Stammlösung wurde für die Injektionen benutzt.

Nach 24 Stunden wurden alle Tiere durch Nackenschlag getötet. Die Bauchhaut wurde mit Schere und Pinzette schonend entnommen und in 4%iges Formalin gegeben.

Die Versuchsreihe B umfaßt 133 Tiere, die zu Beginn ebenfalls 3 - 5 Tage alt waren.
Diese Tiere wurden entweder mit verschiedenen Dosen von Ribofl.-5'-p Na (50, 100 und 200 mg/kg) 13, 20 oder 28 mal gespritzt oder erhielten physiologische NaCl-Lsg.

50 mg/kg Ribofl.-5'-p Na erhielten 22 homozygote Tiere, 11 im blauen, 4 im weißen Licht und 7 im Dunkelraum.

15 Tieren (8 homo- und 7 heterozygoten Gunn-Ratten) wurde das gleiche Volumen physiologischer NaCl-Lösung s.c. injiziert. 4 homozygote Tiere wurden blau und 4 weiß bestrahlt. 7 heterozygote Gunn-Ratten blieben im Dunkelraum.

100 mg/kg Ribofl.-5'-p Na erhielten 28 homozygote Tiere, 10 Tiere im blauen, 9 im weißen Licht und 9 im Dunkelraum. 20 Tieren wurde das gleiche Volumen physiologischer NaCl-Lösung s.c. injiziert. 6 homozygote Tiere wurden blau, 7 weiß bestrahlt und 7 im Dunkelraum gehalten.

200 mg/kg Ribofl.-5'-p Na erhielten 30 homozygote Gunn-Ratten, 10 Tiere unter blauem (diese starben alle), 10 unter weißem Licht und 10 Tiere im Dunkelraum.
18 Tieren wurde das gleiche Volumen physiologischer NaCl-Lösung s.c. injiziert. Je 6 Tiere wurden mit blauem und weißem Licht bestrahlt bzw. im Dunkeln gehalten.

Die Versuchstiere erhielten bis zu 28 mal jeden 2. Tag eine Ribofl.-5'-p Na-Injektion. Nach 12 Injektionen, am 26. Tag, wurden die Versuchstiere gewogen. Bei 12 Tieren (je 4 unter blauem, weißem Licht oder im Dunkeln) wurden regelmäßige Serumbilirubinkontrollen durchgeführt. Bei den übrigen Tieren erfolgten die Kontrollen stichprobenweise. Dann wurde auch gleichzeitig der Hämatokrit bestimmt.

Wie WIRJADI und LIETZ führte ich die Bilirubinbestimmungen am Eppendorf Photometer in einer Mikromethode nach SCHELLONG und WENDE durch. Es wurde streng darauf geachtet, daß kein Licht die Serumproben während der Bestimmung erreichte.

Nach Abschluß des Versuches wurden die Ratten dekapitiert. Das Gehirn wurde für die histochemischen Untersuchungen

gewonnen. Kleinhirn und Stammhirn wurden vom Großhirn getrennt, auf einen Metall-Block gesetzt und mit CO_2 rasch tiefgefroren. Die Anfertigung der Schnitte von Kleinhirn und Stammhirn geschah mit Hilfe eines Cryostaten in caudo-cranialer Richtung. Die Schnitte wurden auf Objektträgern bei -25°C aufbewahrt.
Nach der Methode von BARKA und ANDERSON wurden folgende oxydative Enzyme dargestellt: LDH, SDH, DPNH-diaphorase und NADH2R.
Parallel dazu wurden Hirnschnitte mit Hämatoxylin-Eosin (H.E.) angefärbt. HANEFELD und NATZSCHKA hatten festgestellt, daß gewöhnlich mehr Purkinje-Zellen in den H.E.-Präparaten zu sehen sind als in den Enzym-Präparaten. Sie kamen zu folgendem Schluß:
Im H.E.-Präparat werden a uch noch avitale Zellen angefärbt.
Mit dem histochemischen Enzymnachweis kann man die Zellschädigung im Beginn des Kernikterus besser zeigen. Eine Verringerung der oxydativen Enzymaktivität weist auf einen gestörten Zellstoffwechsel hin, eine Folge des zytotoxischen Bilirubineffektes.

Nach der Präparation des Gehirns wurde auf jedem Rattenrücken ein Hautfeld von 2 cm Durchmesser durch Stempelaufdruck markiert. Das Feld wurde herausgeschnitten. Sein Fell wurde mit dem Rasierapparat abgeschoren und die Haarmenge gewogen.
Die Ratten wurden dann an zwei weiteren Stellen (am Bauch und Rücken) in einiger Entfernung von der Injektionsstelle geschoren. Von dort wurden zwei Hautstücke entnommen und in 4%igem Formalin fixiert.

Herstellung der histologischen Haut-Präparate:

Zur Herstellung der histologischen Präparate wurden die Hautstücke nach dem Fixieren in Formalin und nach mehr-

facher Spülung mit Alkohol in Paraffin eingebettet. Schnitte wurden mit dem Mikrotom hergestellt.
Von jeder Paraffineinbettung wurden zwei Einzelschnitte mit H.E. gefärbt (ROMEIS § 703), und in zwei weiteren wurde die P A S - Reaktion nach Mc MANUS (§ 1121) Färbung beurteilt.

Die Auswertung der histologischen Präparate erfolgte nach bestimmten, im voraus festgelegten Kriterien, wie Dicke der Epidermis, Zahl der übereinanderliegenden Epidermiszellen, Kontur, Struktur und Anordnung der Zellen der Epidermis.

Die Messung der Dicke der Epidermis erfolgte mittels eines Zeißschen Okularmikrometers bei 500facher Vergrößerung an jedem Schnitt an zehn verschiedenen Stellen. Somit lagen von jeder Hautprobe 10 Einzeldickenmessungen vor, deren Mittelwert als Ergebnis der Dickenmessung dieser Hautprobe protokolliert wurde.

Messung der Zahl der übereinanderliegenden Epidermiszellen:
An für die Dickenmessungen geeignet erscheinenden Stellen des histologischen Schnittes wurde die Höhe des Epithels durch Zählen der übereinanderliegenden Zellkerne ermittelt.
Ihr Mittelwert wurde als Ergebnis der Zellzahl dieser Hautprobe protokolliert.

In einem Zusatzversuch wurde Ribofl.-5'-p Na in ikterischem und nicht ikterischem Gunn-Ratten-Serum gelöst und in vitro in offenen Glasröhrchen blau bestrahlt. Mit dem Auge konnten eintretende Farbänderungen registriert werden.
Die Bilirubinkonzentration wurde chemisch mit der oben

erwähnten Mikromethode nach SCHELLONG und WENDE ermittelt. Nach den Untersuchungen von WIRJADI und LIETZ beeinflußt die Anwesenheit von Riboflavin das Ergebnis dieser Bilirubinbestimmungsmethode nicht, wenn jeder Lichtzutritt vermieden wird. Parallel dazu wurden von MÖNCH Spektralanalysen nach unterschiedlich langer Bestrahlung vorgenommen.

ERGEBNISSE:

Zu Beginn der Versuchsreihen stand noch nicht fest, ob nach den Ribofl.-5'-p Na-Injektionen Hautveränderungen faßbar wurden und wenn ja, zu welchen Zeiten.
Um dieses festzustellen, wurden in Vorversuchen homozygote Ratten nach einer Ribofl.-5'-p Na-Injektion von 200 mg/kg subcutan am Rücken 3, 12, 24, 48 und 72 Stunden lang mit blauem Licht bestrahlt. (Siehe Tabelle 1)

Tiere, die 3 Stunden bestrahlt wurden, zeigten eine leichte Epidermisschwellung. Diese hatte nach 12 Stunden etwas zugenommen. Bei Tieren, die 24 Stunden bestrahlt wurden, konnten die stärksten Veränderungen festgestellt werden (Abb. 1a). Nach 48- und 72-stündiger Bestrahlung war wieder eine Abnahme der Epidermisschwellung zu beobachten. Darüber hinaus war nach 24-stündiger Bestrahlung die P A S - Reaktion der Epidermiszellen verstärkt positiv (Abb. 1d), die Zellkonturen zeigten eine unscharfe Begrenzung, und bei der Zellstruktur waren pyknotische Kerne und/oder Vakuolen zu beobachten. Die Anordnung der Zellen war unregelmäßig. Bei den im Dunkeln gehaltenen Tieren entwickelte sich nach der Riboflavin-Injektion nur eine geringe Epidermisschwellung. Störungen der Zellstrukturen waren nur bei einzelnen Tieren erkennbar und generell weniger stark ausgeprägt als bei bestrahlten.

Da aus den Vorversuchen zu ersehen ist, daß nach 24 Stunden die deutlichsten Veränderungen erkennbar sind, wurde bei den Hauptversuchen mit dieser Bestrahlungsdauer gearbeitet.

Tab. 1 Zusammenstellung der mikroskopisch erfaßten Parameter an der Epidermis 3, 12, 24, 48 und 72 Std. nach Injektion von 200mg/kg Riboflavin -5'-phosphat Na.

	PAS-Färbung		Dicke der Epidermis in µ		Zahl der übereinanderliegenden Ep.Zell.		Kontur ☆☆ der Zellen		Struktur ☆☆☆		Anordnung ☆☆☆☆	
	blau	dunkel	blau	dunkel	blau	dunkel	blau	dunkel	blau	dunkel	blau	dunkel
3 Std.	2-	2-	50,5	42	3,4	3,0	2+	2+	2-	2-	2+	2+
n = 2	2											1-
12 Std.	2+	2-	52	49,5	3,2	2,8	1+	2-	2-	2+	2+	2+
n = 2	2						1-					
24 Std.	3+	2-	71,6	50,5	3,2	3,2	3-	2+	2+	2-	3-	1-
n = 3	2								1-			1+
48 Std.	3-	4-	53,3	43,25	3,5	2,7	3+	3+	3-	4-	3+	3+
n = 3	4							1-				1-
72 Std.	2-	3-	54	43,3	3,7	2,8	3+	3+	3-	3-	3+	3+
n = 2	3		3	3								

+ n = Zahl der untersuchten Tiere

☆☆
+ scharf begrenzt
- nicht scharf begrenzt

☆☆☆
+ pyknotischer Kern und/oder Vakuole
- normale Zell-Kern-Plasma-Relation keine Vakuole

☆☆☆☆
+ regelmäßig
- unregelmäßig

Tabelle 2 Zusammenstellung der mikroskopisch erfaßten Parameter an der Epidermis

24 Stunden nach Injektion verschiedener Dosen von nativem und bestrahltem Ribofl.-5'-p Na

	P A S - Färbung			Dicke der Epidermi s in			Zahl der über liegenden Epi	
	blau	weiß	dunkel	blau	weiß	dunkel	blau	weiß
Homozygote Tiere								
2oomg/kg:Ribofl.-5'-p Na	1o+	1o-	1o-	62,95±8,5	42,36 ± 4,3	37,75±1,95	3,4	2,4
n =	11	1o	1o					
1oomg/kg:Ribofl.-5'-p Na	4-			47,o ±3,2			2,6	
n =	4							
5omg/kg:Ribofl.-5'-p Na	5-			41,48±2,18			2,5	
n =	5							
in vitro bestrahltes Ribofl.-5'-p Na entsprechend 2oomg/kg	9-		9-	37,52±1,95		37,41±2,61	1,8	
n =	9		9					
o,o2ml/g:physiolog. NaCl-Lösung	5-	5-	5-	39,84±2,9	38,1 ± 1,4	39,6 ±2,8	2,3	2,2
n =	5	5	5					
Heterozygote Tiere								
2oomg/kg:Ribofl.-5'-p Na	5+	5-	5-	5o,88±6,5	43,61 ± 5,5	41 ± 5	2,5	2,5
n =	5	5	5					

n = Zahl der untersuchten Tiere

★★ + scharf begrenzt
- unscharf begrenzt

...er- ...-Zellen	Kontur ★★ d e r Z e l l e			Struktur ★★★ n d e r E p i d e r m i s			Anordnung ★★★★		
dunkel	blau	weiß	dunkel	blau	weiß	dunkel	blau	weiß	dunkel
...,4	4+ 2–	10+	8+ 2–	7+ 3–	1+ 7–	10	10–	10+	8+ 2–
	4+			4+			4+		
	8+ 1–			4– 4			4+ 1–		
1,8	3+ 3–		6+ 3–				5+ 4–		5+ 4–
2,3	5+	5+	5+	5–	5–	5–	5–	3+ 2–	5+
2,5	1+ 4–	4+ 1–	5+	5–	1+ 4–	5–	5–	5–	3–

★ – Normale Zell-Kern-Plasma-Relation
Keine Vakuolen

\+ pyknotischer Kern und/oder
Vakuolen

★★★★ + regelmäßig
– unregelmäßig

A. Ergebnisse der histologischen Untersuchungen der Hauptversuche:

1. Beurteilung der histologischen Präparate nach 24 Stunden

In Tabelle 2 sind die mikroskopisch erfaßten Parameter an der Epidermis aller Versuchs- und Kontrollratten aufgeführt.
Hochdosiertes natives Ribofl.-5'-p Na bewirkt bei homo- und heterozygoten Tieren eine verstärkt positive intrazelluläre P A S - Reaktion, wenn gleichzeitig blau bestrahlt wird (Abb. 1d). Es führt zur Epidermisschwellung am intensivsten bei 200 mg/kg (Abb. 1a), aber auch bei 100 mg/kg bei gleichzeitiger blauer Bestrahlung. Diese Effekte hat in vitro vorbestrahltes Ribofl.-5'-p Na nicht. Weiß bestrahlte Tiere unterscheiden sich nicht markant von den Tieren im Dunkeln. Bestenfalls läßt sich bei ersteren (nach 200 mg/kg) eine leichte Epidermisschwellung ablesen.
Zu deutlich positiven P A S - Reaktionen kommt es nicht. Homozygote und heterozygote Gunn-Ratten reagieren gleichartig.

2. Beurteilung der histologischen Präparate der Langzeitversuche

Die histologische Auswertung der Langzeitversuche, bei denen die Tiere mehrfach jeweils im Abstand von 48 Stunden Ribofl.-5'-p Na bzw. NaCl-Injektionen erhielten, zeigte keine Veränderungen:

Dicke der Epidermis, Zahl der übereinanderliegenden Epidermiszellen, Kontur, Struktur und Anordnung der Zellen der Epidermis wiesen bei Bestrahlung und im Dunkeln keine Differenzen auf. Es kommt offenbar

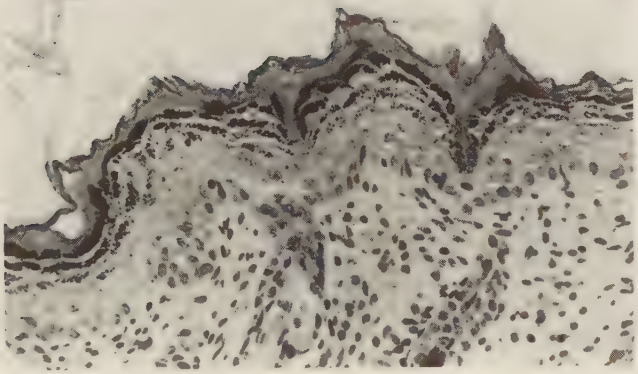

Abb. 1a

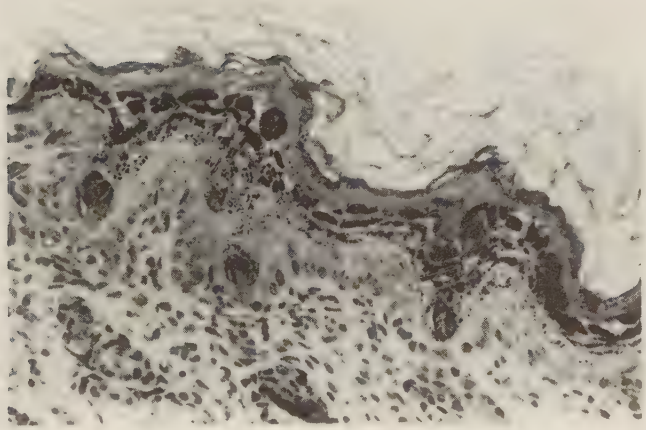

Abb. 1b

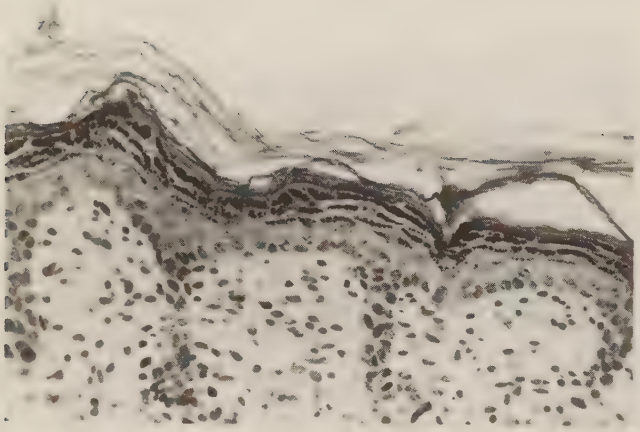

Abb. 1c

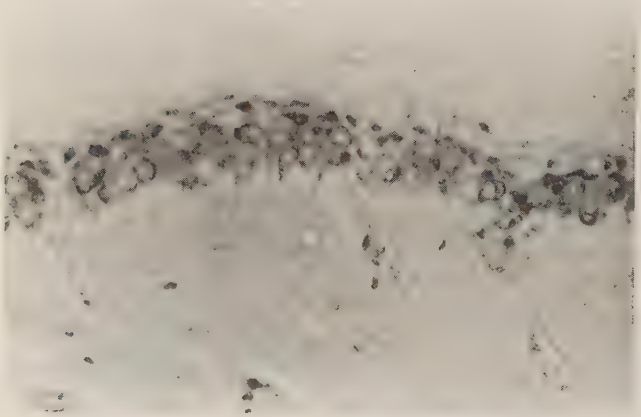

Abb. 1d

Abb. 1e

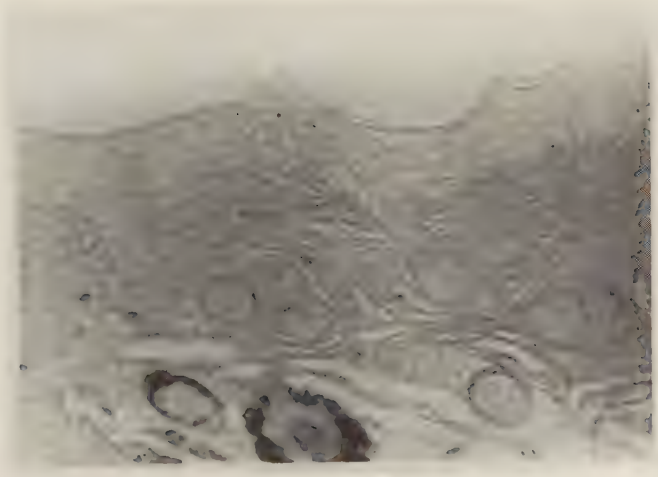

Abb. 1f

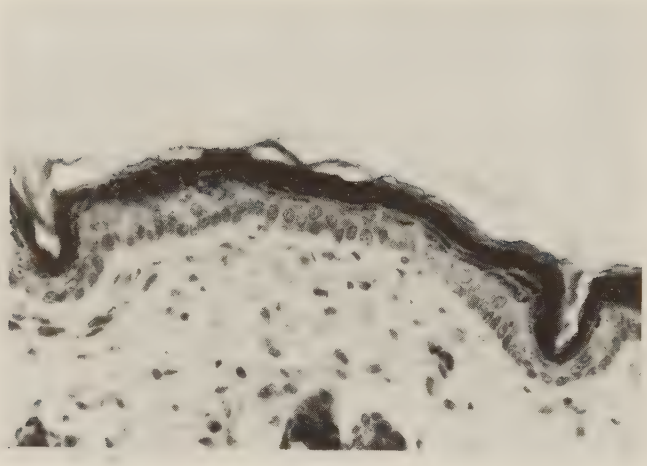

Abb. 1g

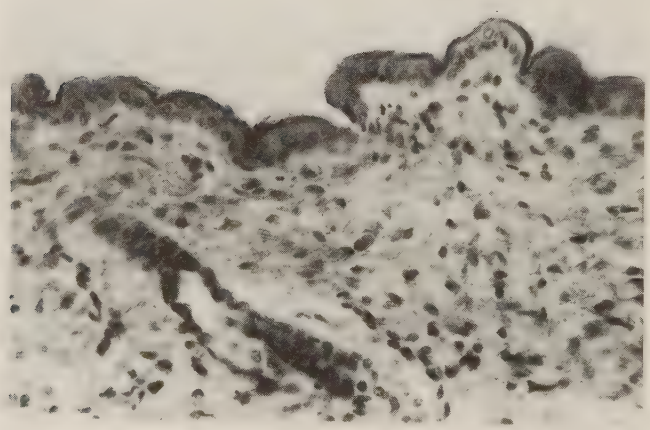

Abb. 1h

Abb. 11

Abb 1j

Abb. 1a - j

Histologische Präparate der Bauchhaut homozygoter Gunn-Ratten.

1a. 24 Std. nach blauer Phototherapie und Injektion von 200 mg/kg Ribofl.-5'-p Na. H.E.-Färbung, Vergrößerung 1:125

1b. 24 Std. nach blauer Phototherapie und Injektion von 100 mg/kg Ribofl.-5'-p Na. H.E.-Färbung, Vergrößerung 1:125

1c. 24 Std. nach Injektion von 200 mg/kg Ribofl.-5'-p Na. ohne Phototherapie. H.E.-Färbung, Vergrößerung 1:125

1d. wie a., PAS-Reaktion (positive Reaktion), Vergrößerung 1:125

1e. wie b., PAS-Reaktion (negative Reaktion), Vergrößerung 1:125

1f. wie c., PAS-Reaktion (negative Reaktion), Vergrößerung 1:125

1g. Langzeitversuch mit blauer Phototherapie und 13-maliger Injektion von 100 mg/kg Ribofl.-5'-p Na. H.E.-Färbung, Vergrößerung 1:125

1h. Langzeitversuch ohne Phototherapie und 13-maliger Injektion von 200 mg/kg Ribofl.-5'-p Na. H.E.-Färbung, Vergrößerung 1:125

1i. wie g., PAS-Reaktion (negative Reaktion) Vergrößerung 1:125

1j. wie i., PAS-Reaktion (negative Reaktion) Vergrößerung 1:125

nicht zu einer Potenzierung der entzündlichen Hautveränderungen. Bei 2 der 10 Tiere, die mehrfach mit 100 mg/kg Ribofl.-5'-p Na gespritzt und blau bestrahlt wurden, traten Nekrosen an Pfoten und Schwanz auf. Siehe Abb. 2; beide Tiere starben. Histologische Untersuchungen der Bauch- und Rückenhaut wurden leider nicht vorgenommen.

B. Gewichtsverhalten

Tabelle 3 zeigt, daß mehrfache Injektionen von Ribofl.-5'-p Na bzw. NaCl-Lösung unter verschiedener Bestrahlung keinen wesentlichen Einfluß auf die Gewichtszunahme der Tiere haben.
Es läßt sich feststellen, daß das nach 24 Tagen erreichte Gewicht vor allem vom Ausgangsgewicht beeinflußt wird. Tiere mit mehr als 8,5 g Ausgangsgewicht haben im Mittel 50,5 $\pm$ 4,6 g zugenommen.
Tiere mit weniger als 8,5 g Ausgangsgewicht haben im Mittel 37 $\pm$ 3,6 g zugenommen. Die Schwankungen sind bei den einzelnen Würfen relativ groß. Der Gewichtszuwachs geht nicht in allen Gruppen mit dem Ausgangsgewicht parallel.
Tiere, die 200 mg/kg des Ribofl.-5'-p Na erhielten, haben sowohl unter weißem Licht als auch im Dunkeln in Bezug auf das Ausgangsgewicht relativ wenig zugenommen.
Hier mag sich bei Berücksichtigung der Letalität ein Trend zu einer gewissen Schädigung ablesen lassen.

Abb. 2
Nekrosen am Schwanz und Hinterpfoten (↗)
der Ratte rechts im Bild (nach mehrfacher Injektion
von 100 mg/kg Riboflavin -5'-p Na unter blauem Licht)
Links gleichalte Ratte ohne derartige Veränderungen

Tabelle 3

	Gewicht nach 24 Tagen	Ausgangs-gewicht	Gewichts-zunahme in 24 Tagen
blau			
Homozygote Tiere 2oomg/kg:Robofl.5'-pNa			
1oomg/kg:Ribofl.5'-pNa n = 4	55,8±11,9	9,6±2,5	46,2± 9,5
5omg/kg:Ribofl.5'-pNa n = 1o	6o,2± 6,9	8,7±1,4	51,5± 5,7
Physiologische NaCl-Lösung n = 9	66,8±1o,7	1o ± 2	56,9± 9,2
weiß			
2oomg/kg:Ribofl.5'-pNa n = 8	57,9±11,7	1o,6±2,9	48,6±1o,5
1oomg/kg:Ribofl.5'-pNa n = 5	49,85±12,38	8,4±1,7	41,5±1o,8
5omg/kg:Ribofl.5'-pNa n = 4	41 ± 1,2	7,5±1,1	33,6± 1,6
Physiologische NaCl-Lösung n = 11	52,5±11,6	8,6±2,4	43,9± 9,9
dunkel			
2oomg/kg:Ribofl.5'-pNa n = 6	42,94± 7,9	8,5±1,2	34,4± 8,6
1oomg/kg:Ribofl.5'-pNa n = 4	44,3± 2,9	7,7±o,2	36,6± 2,9
5omg/kg:Ribofl.5'-pNa n = 5	64,2± 8,6	9,3±1,2	54,9± 7,7
Physiologische NaCl-Lösung n = 9	48,5± 6	8 ± 1	4o,5± 5,9
Heterozygote Tiere Physiologische NaCl-Lösung n = 6	61,6± 11	9,8± 3	51,8±12,8

Tabelle 3 a Tiere mit mehr als 8,5 g Ausgangsgewicht

Ausgangsgewicht	Gewichtszunahme
1o,6 ± 2,9	48,6 ± 1o,5
1o ± 2	56,9 ± 9,2
9,8 ± 3	51,8 ± 12,8
9,6 ± 2,5	46,2 ± 9,5
9,3 ± 1,2	54,9 ± 7,7
8,7 ± 1,4	51,5 ± 5,7
8,6 ± 2,4	43,9 ± 9,9
9,5	5o,5

Tiere mit 8,5 g Ausgangsgewicht oder weniger

Ausgangsgewicht	Gewichtszunahme
8,5 ± 1,2	34,4 ± 8,6
8,4 ± 1,7	41,5 ± 1o,8
8 ± 1	4o,5 ± 5,9
7,7 ± o,2	36,6 ± 2,9
7,5 ± 1,1	33,6 ± 1,6
8	37

Überlebensrate:

Tabelle 4 gibt eine Übersicht der Überlebensrate der Ratten nach mehrfacher Verabreichung von Ribofl.-5'-p Na bzw. NaCl-Lösung in verschiedenen Dosen und unterschiedlicher Bestrahlung.
Dabei fiel auf, wie bereits in den Kurzzeitversuchen von WIRJADI und LIETZ, daß die Ratten, die blau bestrahlt wurden und 200 mg/kg Ribofl.-5'-p Na erhielten, eine besonders hohe Sterblichkeit aufwiesen. Auch unter weißem Licht und im Dunkeln haben einige Tiere diese Dosis nicht überlebt.

Wirkung von in vitro vorbestrahltem Ribofl.-5'-p Na auf die Letalität und das Gewicht der Ratten:

Aus Tabelle 5 ist zu ersehen, daß alle Versuchstiere überlebten und alle Tiere haben etwa gleichartig an Gewicht zugenommen.

C. Dicke des Fells

Die makroskopische Betrachtung zeigte bei den bestrahlten und den im Dunkeln gehaltenen Tieren einen deutlichen Unterschied in der Fellfärbung und -dichte.
Das Fell der bestrahlten Ratten wirkte dünn und weiß gebleicht, das der im Dunkeln gehaltenen Tiere dicker und von gelblicher Färbung.
Das Wiegen des Fells ließ einen Trend erkennen, daß das Fell nach intensiver (blauer) Bestrahlung weniger dicht war als bei Tieren, die im Dunkeln gehalten wurden. Weiß bestrahlte Ratten nahmen eine Mittelstellung ein.
Die Werte sind in Tabelle 6 zusammengestellt. Sie müssen als Annäherungswerte angesehen werden, da nicht zwischen Männchen und Weibchen unterschieden wurde.

Tabelle 4 Überlebensrate blau und weiß bestrahlter bzw. im Dunkeln gehaltener homozygoter Tiere bei mehrfacher Verabreichung unterschiedlicher Dosen von Ribofl.-5'-p Na bzw. NaCl-Lösung

Dosis	Zahl der Tiere zu Beginn	davon am Leben nach den Injektionen	o,9%ige NaCl-Lösung zu Beginn	davon am Leben nach den Injektionen
blau				
5omg/kg	11	11		
1oomg/kg	1o	1o	16	16
2oomg/kg	1o	1		
weiß				
5omg/kg	4	4		
1oomg/kg	9	9	17	14
2oomg/kg	1o	8		
dunkel				
5omg/kg	7	6		
1oomg/kg	9	7	13	11
2oomg/kg	1o	6	(+7hetero-zygote Gunn-Ratten)	(+7hetero-zygote Gunn-Ratten)

Tabelle 5 4 Tage-Überlebensrate und Gewichtzunahme bei nicht bestrahlten heterozygoten Gunn-Ratten nach einer subcutanen Injektion von in vitro bestrahltem Ribofl.-5'-p Na

Dosis: entsprechend	zu Beginn	davon am Leben 4 Tage nach der Injektion	Gewichtszunahme in 4 Tagen
500mg/kg (0,05ml/g)	5	5	3,4 ± 1,3 g
600mg/kg (0,06ml/g)	6	6	3,3 ± 0,9 g
800mg/kg (0,08ml/g)	6	6	3,6 ± 1 g
1200mg/kg (0,12ml/g)	4	4	5,5 ± 1 g
1600mg/kg (0,16ml/g)	3	3	3,4 ± 1,2 g

Tabelle 6 Dicke des Fells bei lange Zeit bestrahlten Tieren

	blau	weiß	dunkel
Mittelwert:	6,4 / 8,9	7 / 13	10 / 12
in mg n =	11 11	14 13	14 15

\+ Zähler: Meßwert für 13 mal gespritzte Tiere

++ Nenner: Meßwert für 2o-28 mal gespritzte Tiere

D. Serumbilirubin und Hämatokrit:

Bei den Langzeitversuchen wurden in einer Gruppe von 12 Tieren, die jeden 2. Tag 100 mg/kg Ribofl.-5'-p Na erhielten Serumbilirubinbestimmungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3 dargestellt.

Die Blutentnahme erfolgte jeweils vor der nächsten Injektion, d.h. 48 Stunden nach der vorangegangenen. Während des Wiegens, des Käfigwechselns und der Blutentnahme befanden sich alle Ratten, auch die sogenannten Dunkeltiere, für kurze Zeit unter normaler Raumbeleuchtung. Aus der Abbildung ist erkennbar, daß im Dunkeln die mittlere Serumbilirubinkonzentration in den ersten zwei Lebenswochen kontinuierlich ansteigt bis auf Werte nahe 15 mg % und nach der dritten Lebenswoche allmählich absinkt. Das ist für homozygote Gunn-Ratten typisch.
JOHNSON und Mitarbeiter haben entsprechende Kurven veröffentlicht. Unter blauer Bestrahlung kommt es gleich nach Versuchsbeginn zu einem Abfall der Bilirubinkonzentration. Während des gesamten Beobachtungszeitraumes

liegen die Werte der blau bestrahlten Ratten unter 5 mg % und deutlich unter denen der weiß bestrahlten oder im Dunkeln gehaltenen Tiere.
Es besteht bei den blau bestrahlten kein sicherer Unterschied zwischen Riboflavin behandelten Tieren und solchen, die Injektionen von NaCl-Lösung erhielten.
Ein solcher Unterschied ist dagegen sowohl bei den weiß bestrahlten als auch bei den im Dunklen gehaltenen Tieren zwischen ca. 10 und 28 Tagen vorhanden. Das Serumbilirubin der mit Riboflavin behandelten Ratten liegt während dieser Zeit deutlich unter dem der mit NaCl-Lösung gespritzten. Bei den sogenannten Dunkeltieren hat offenbar bereits der Kurze Aufenthalt bei Raumbeleuchtung ausgereicht, um eine durch Riboflavin potenzierte Photooxydation herbeizuführen.

Die gleichzeitig ermittelten Hämatokritwerte sind in Tabelle 7 angegeben. In allen Gruppen wurden im zweiten Lebensmonat etwas höhere Werte bestimmt als im ersten Monat. Ein gewisser Tiefpunkt zeichnet sich zwischen dem 18. und 20. Lebenstag ab.

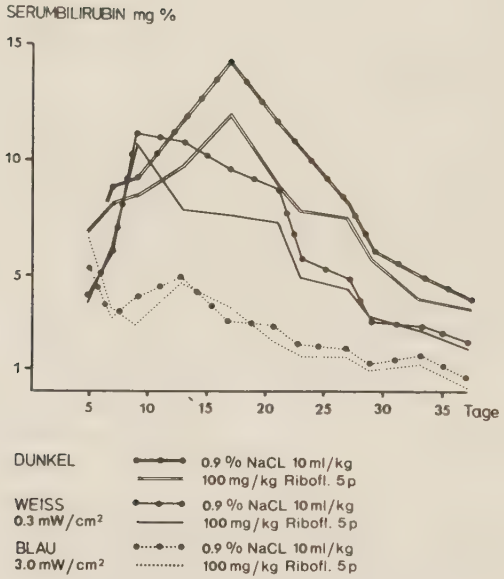

Abb. 3
Serumbilirubinkonzentrotion in dem Langzeitversuch

Tabelle 7 Mittelwerte des Hämatokrits in den Langzeitversuchen

Ribofl.-5'-p Na			NaCl-Lösung		
HKT Mittelwert	Bestimmung am .. Lebenstag	Zahl der Tiere	HKT Mittelwert	Bestimmung am .. Lebenstag	Zahl der Tiere
blau					
36,5	12.	5			
32	16.	4	29	16.	4
29	18.	4	25	18.	3
33	28.	2	32	28.	4
35	32.	2	32	3o.	3
4o	42.	3	34	32.	2
43	46.	4			
weiß					
3o	12.	5	3o	12.	3
39	14.	5	39,6	14.	3
23	22.	5	3o	2o.	3
33	28.	5	31	28.	1
36	32.	3	45	36.	2
41	36.	2	41	44.	2
42	44.	3			
39	52.	4			
dunkel					
3o	12.	6			
33	14.	5			
32	16.	5	29	12.	6
34	26.	3	32	28.	3
34	28.	2	33	28.	3
41	4o.	2	39	4o.	2
34	48.	3	42	48.	2
44	5o.	3			

E. Ergebnisse der histochemischen Untersuchungen des Kleinhirns:

Tabelle 8 zeigt den Grad der Schädigung der Purkinje-Zellen. Die Bewertung der Präparate wurde von HANEFELD vorgenommen. Bei den in Reihen angeordneten Purkinje-Zellen ist das Vorhandensein bzw. Fehlen (Verlust) mehrerer oxydativer Fermente bewertet worden.
Bei homozygoten Gunn-Ratten, die NaCl-Lösung erhielten, zeigten sich im Dunkeln die schwersten Schädigungen der Purkinje-Zellen. Bei 4 von 7 Tieren lag ein schwerer Purkinje-Zellverlust (PZV) vor.
Bei Bestrahlung mit weißem Licht waren die Ganglienzellen vitaler. Nur bei 2 von 1o Tieren war ein starker PZV eingetreten.
Die besten Ergebnisse ergaben sich nach blauer Bestrahlung: Nur 1 von 9 wies einen starken Ausfall auf.

Von den Tieren, die Ribofl.-5'-p Na erhielten und im Dunkeln gehalten wurden, zeigten 4 von 1o starke Schädigungen, bei den mit weißem Licht bestrahlten Tieren 5 von 14. Durch die Riboflavininjektionen, die nach den Ergebnissen von WIRJADI und einzelnen von mir durchgeführten Stichproben zu einer mindestens zeitweiligen stärkeren Senkung der Bilirubinplasmakonzentration geführt hatten, war es offenbar bei letzteren nicht zu einer Protektion der Ganglienzellen gegenüber der Bilirubinzytotoxizität gekommen.
Die Ganglienzellen der mit Riboflavin behandelten und mit blauem Licht bestrahlten Tiere waren gut erhalten. Bei keiner der 11 untersuchten Ratten war es zu schwerem PZV gekommen. Ein sicherer Unterschied zu den Kontrolltieren, die NaCl-Lösung erhielten, ergab sich auch in dieser Gruppe nicht.

Tabelle 8 Histochemische Untersuchungen des Kleinhirns bei häufig mit nativem Ribofl.-5'-p Na bzw. NaCl-Lösung gespritzten Tieren mit und ohne Bestrahlung

	blau			gleiche Volumina			weiß		
	Riboflavin			o,9%ige NaCl-Lösung			Riboflavin		
	o.B(+)	+-++	++-+++	o.B(+)	+-++	++-+++	o.B(+)	+-++	++-++
5omg/kg									
13x	2			1	1			2	
2ox									
23x		1		2				2	
28x		4							
1oomg/kg									
13x	1	3		1	7			4	2
2ox		2				1			3
2oomg/kg									
13x								1	2
2ox								2	
22x									
	3	1o	o	4	8	1	o	11	7

o.B(+) = normal, kein sicherer PZV (Purkinje-Zell-Verlust)

+-++ = mäßiger PZV

++-+++ = starker PZV

	gleiche Volumina			dunkel			gleiche Volumina		
	o,9%ige NaCl-Lösung			Riboflavin			o,9%ige NaCl-Lösung		
+	o.B(+)	+-++	++-+++	o.B(+)	+-++	++-+++	o.B(+)	+-++	++-+++
		2							
		2				3			
		2	3	2	3	1		1	2
	1	1						1	1
		1			2	1		1	3
			2						
	1	8	5	2	5	5	o	3	6

In den Abb. 4-8 sind die Ergebnisse der Zusatzversuche mit in vitro Bestrahlungen von riboflavin- und bilirubinhaltigen Seren dargestellt. Abb. 4 zeigt die Spektralanalyse eines nicht ikterischen Serums (von heterozygoter Gunn-Ratte), dem je ml 0,2 mg Ribofl.-5'-p Na zugefügt wurden, vor sowie 2,4 und 24 Stunden nach intensiv blauer Bestrahlung. Die mit den Augen wahrnehmbare Farbe blaßte mit zunehmender Bestrahlung ab. Der ursprünglich bei 435 nm vorhandene Peak flacht ab. Nach 2 Stunden scheint das Maximum etwas in den kurzwelligen Bereich verschoben. Nach 4 Stunden ist kein Peak mehr erkennbar, sondern nur noch eine flachere von links oben nach rechts unten leicht geschwungen verlaufende Linie. Nach 24 Stunden findet sich eine gleichartige Linie deutlich oberhalb der Zwei- und Vier-Stunden-Linie. Die gemessenen leicht schwankenden Bilirubinwerte dürften im Fehlerbereich der Methode liegen.
Wird natives ikterisches Serum (von homozygoter Gunn-Ratte) Abb. 5 gleichartig bestrahlt, kommt es zu einem Farbwechsel von gelb nach grün. Der bei 435 nm gelegene Peak flacht mit zunehmender Bestrahlung merklich ab, in Übereinstimmung mit einer Verminderung der chemisch nachweisbaren Bilirubinkonzentration, ebenso die Schulter bei 45o-46o nm. Die 24-Stunden-Kurve verläuft tief unter der 4-Stunden-Kurve.
Praktisch das gleiche Bild ergibt sich, wenn die Bilirubinkonzentration des Ausgangsserums durch Zugabe kristallinen Bilirubins von 4,2 auf 6,8 mg % angehoben wird (Abb. 6).

Abbildung 7 stellt den Kurvenverlauf dar, nachdem zu dem nativen ikterischen Serum der Abb. 5 Ribofl.-5'-p Na (0,2 mg/ml) gegeben worden war. Durch den Flavinzusatz bleibt die Grünverfärbung aus. Der Abbau des Peak erfolgt wesentlich rascher. Die 24-Stunden-Kurve liegt über der 4-Stunden-Kurve.

Abbildung 8 ähnelt der Abbildung 7 hinsichtlich des raschen Abbaues des Peaks. Es handelt sich um das gleiche mit Bilirubin angereicherte Serum wie in Abbildung 6, dazu ist Ribofl.-5'-p Na in gleicher Menge wie in Abbildung 4 oder 7 gegeben. Die 24-Stunden-Kurve liegt dicht unterhalb der 4-Stunden-Kurve. Der beschleunigte Abfall der Bilirubinkonzentration wird beim Vergleich mit Abbildung 6 deutlich.

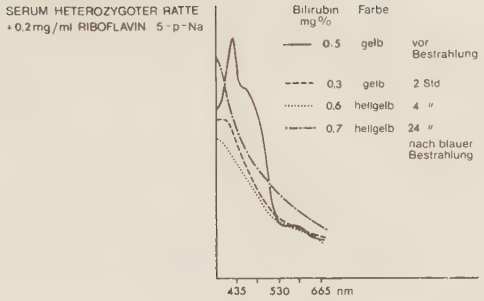

Abb. 4

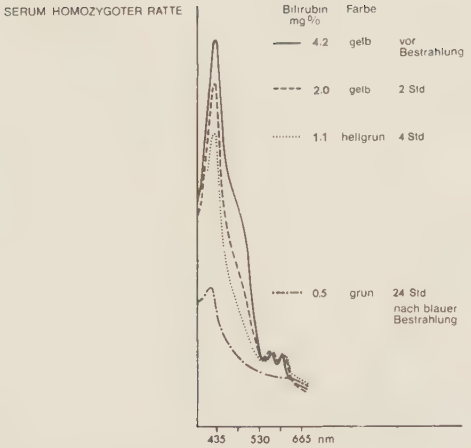

Abb. 5

Abb. 4 - 8 Spektralanalysen von Rattenserum mit und ohne Riboflavin- und Bilirubinzusatz

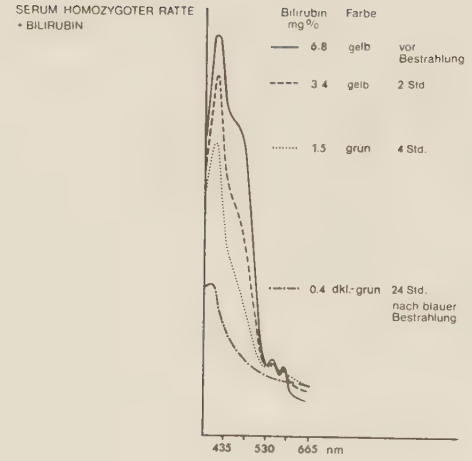
SERUM HOMOZYGOTER RATTE
+ BILIRUBIN
Bilirubin mg%
Farbe
6.8 gelb vor Bestrahlung
3.4 gelb 2 Std
1.5 grün 4 Std.
0.4 dkl.-grün 24 Std. nach blauer Bestrahlung
435 530 665 nm

Abb. 6

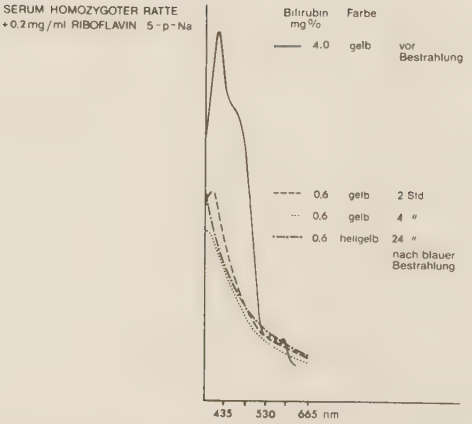
SERUM HOMOZYGOTER RATTE
+0.2 mg/ml RIBOFLAVIN 5-p-Na
Bilirubin mg%
Farbe
4.0 gelb vor Bestrahlung
0.6 gelb 2 Std
0.6 gelb 4 "
0.6 hellgelb 24 "
nach blauer Bestrahlung
435 530 665 nm

Abb. 7

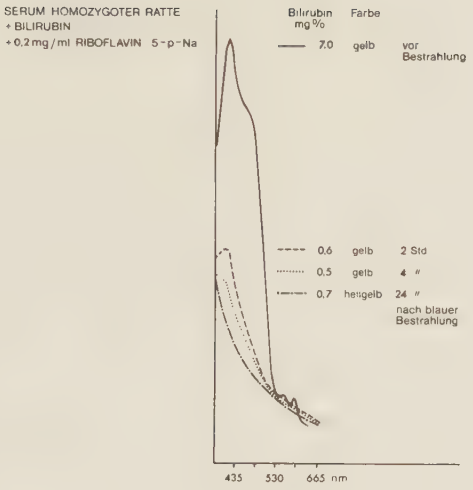
SERUM HOMOZYGOTER RATTE
+ BILIRUBIN
+ 0,2 mg/ml RIBOFLAVIN 5-p-Na
Bilirubin mg%
Farbe
7.0 gelb vor Bestrahlung
0.6 gelb 2 Std
0.5 gelb 4 "
0.7 hellgelb 24 "
nach blauer Bestrahlung
435
530
665 nm

Abb. 8

DISKUSSION

Photosensibilisatoren (photodynamisch wirksame Substanzen) können bei gleichzeitiger Bestrahlung Wirkungen in lebenden Zellen hervorrufen.

TAPPEINER hat bereits 1907 entdeckt, daß mit Eosin angefärbte Bakterien, für die die Färbung allein bedeutungslos ist, bei Belichtung ihre Lebensfähigkeit verlieren.

Manche Moleküle können Lichtenergie nicht direkt in Form von Photonen absorbieren. Sie lassen sich jedoch anregen, indem man die von einem Donatormolekül absorbierte Energie auf sie überträgt. Dieser Vorgang kann zu einer photochemischen Reaktion führen, wobei Peroxyde, Hitze und freie Radikale entstehen können.

Diese photochemischen Reaktionen können Schäden besonders an Zellkernen und Zellmembranen hervorrufen (BAER 1968; SCHENCK 1956). Nach LECHTKEN und TURRO besitzen Sauerstoffmoleküle nur eine geringe Fähigkeit Licht zu absorbieren.

Ein Photosensibilisator kann Lichtenergie aber leicht an Sauerstoffmoleküle abgeben, diese dadurch aktivieren und zu einem aggressiven chemischen Agens machen.

Der Photosensibilisator kann biologische Systeme auch direkt schädigen, indem er bestimmte Bestandteile durch Oxydation inaktiviert. Bei dem oben beschriebenen Vorgang handelt es sich um eine phototoxische Reaktion. Daneben besteht aber auch die Möglichkeit einer photoallergischen Reaktion, bei der die absorbierte Energie dazu dient, ein Hapten zu bilden. Nach Koppelung mit Hautproteinen kann dieses zum Vollantigen werden.

Bei dem in unseren Versuchen verwendeten Ribofl.-5'-p Na handelt es sich um einen Photosensibilisator, der Licht absorbiert und Lichtenergie auf O_2 übertragen kann, wobei Singulett-Sauerstoff entsteht (Pascale et al). Dies entspricht dem Modell der phototoxischen bzw. photodynamischen

Reaktion.
Die histologischen Untersuchungen der Haut von Gunn-Ratten, die blau bestrahlt wurden und eine hohe Dosis Ribofl.-5'-p Na erhielten, ließen deutliche Veränderung erkennen. Die Epidermis zeigte eine starke Schwellung, die jedoch nicht auf eine Vermehrung der Epidermiszellen zurückzuführen war, sondern auf Vacuolisierung und Anschwellung der Zellen (Zellödem). Dieses Zellödem kann die Folge einer Störung von Stoffwechselvorgängen sowie der dadurch bedingten Beeinträchtigung der sogenannten Na-Pumpe sein. Aber auch eine direkte Schädigung der Membranen und eine damit einhergehende gesteigerte Membranpermeabilität sind denkbar. Direkte Ursachen können u.a. Giftstoffe sein.
Eine photoallergische Reaktion kann aus folgenden Gründen ausgeschlossen werden:

1. Perivasculäres Rundzellinfiltrate waren nicht vorhanden.
2. Eine Bestrahlung über verschiedene Zeiträume ließ erkennen, daß die Hautveränderungen nach 24 Stunden am stärksten hervortraten und nach 48 Stunden wieder abklangen.
3. Die mehrmalige Injektion von Ribofl.-5'-p Na in Langzeitversuchen rief keine Verstärkung der Hautveränderungen hervor.

Andere Untersuchungen, die sich mit phototoxischen oder photodynamischen Reaktionen beschäftigten (MIESCHER 1957; 1960), zeigten Hautveränderungen auf, die den von mir beobachteten teilweise entsprechen.
MIESCHER hat festgestellt, daß bei Eindringen einer phototoxischen Substanz in die Haut ein Reaktionsbild entsteht, das gewisse Ähnlichkeit mit der UV-Reaktion der Haut besitzt: vacuoläre Umwandlung der Epithelzellen, Kernpyknose, Achromie.

Allerdings stellte MIESCHER derartige Veränderungen nur nach direkter Applikation an der Hautoberfläche, nicht nach subcutaner Injektion, fest. In diesem Punkt weichen die Ergebnisse meiner Versuche von seinen Befunden ab. Ich habe die zur Diskussion stehenden Veränderungen auch nach s.c. Applikation gesehen.

Bei unseren Versuchen ist aufgefallen, daß Gunn-Ratten, die mit 200 mg/kg Ribofl.-5'-p Na behandelt und intensiv blau bestrahlt wurden, eine besonders hohe Letalität aufwiesen. Vermutlich starben sie nicht an der Hautveränderung. Die eigentliche Ursache ist noch nicht ermittelt worden.
Es konnte beobachtet werden, daß die jungen Tiere schlecht saugten, Gewicht verloren, adynamisch und neurologisch auffällig wurden.
HAUSMANN hat Lichtsensibilisierungen mit Hämatopophyrin bei weißen Mäusen durchgeführt und festgestellt, daß die hohe Sterblichkeit von der Intensität des Lichtes und der Menge des verabreichten Farbstoffes (Sensibilisators) abhängt.

Andere Autoren haben nach Verabreichung verschiedener Stoffe und gleichzeitiger Bestrahlung ebenfalls eine hohe Letalität festgestellt (MIESCHER 196o; SCHULZ, WISKEMAN und WULF 1956; 1961).

Bevor die Tiere starben, wurden einige Auffälligkeiten beobachtet. Die Tiere reagierten mit generalisierten Krämpfen und schnappender Atmung oder fielen im Laufe von Minuten in ein tiefes Koma.
WULF differenziert den Vorgang und unterscheidet:

1. Den Lichtschlag (am schnellsten zum Tode führende Form, primäre Symptome seitens des ZNS)

2. Eine akute Form (primäre Reizerscheinungen an der Körperoberfläche, Kratz- und Putzbewegungen, Lichtscheu, Krämpfe, Tod nach einer bis mehreren Stunden)
3. Eine subakute Form (starke Ödeme stehen im Vordergrund, meist Tod nach 1-2 Tagen)
4. Eine chronische Form (kein Verenden unter oder nach Bestrahlung, nur Ohr- und Schwanznekrose)

In unseren Kurzzeitversuchen starben die Tiere unter dem blauen Licht in der Regel 24-72 Stunden nach der Injektion von 200 mg/kg Riboflavin. Die bei ihnen beobachtete Symptomatik läßt sich nur bedingt in die Gruppe von WULF einordnen. Es handelte sich um eine subakute Verlaufsform. Allgemeine Ödeme (oder eine Gewichtszunahme) fielen nicht auf. In der Epidermis war allerdings eine oedematöse Schwellung nachweisbar.
Es erscheint bemerkenswert, daß es bei den Langzeitversuchen im allgemeinen nicht zu einer Potenzierung der phototoxischen Hautveränderungen kommt. Möglicherweise schützte das sich allmählich ausbildende Fell die Epidermiszellen.
Nach den Untersuchungen von LIETZ sinkt die Serumbilirubinkonzentration bei 1 Monat alten Ratten (mit dichtem Fell) nach subcutaner Injektion von 200 mg/kg Ribofl.-5'-p Na bei blauer Bestrahlung nach 3o Minuten lediglich auf 82 % des Ausgangswertes und nach 3 Stunden auf 6o %.

Bei vier Tage alten Ratten ohne Fell hatte WIRJADI nach der gleichen Dosis einen Abfall auf 29 % nach 3o Minuten und einen auf 23 % nach 3 Stunden beobachtet.

Die in Abb. 2 dargestellten Nekrosen am Schwanz und an den Pfoten entsprechen den von WULF in der Gruppe vier beschriebenen. Beide Tiere, die diese Veränderungen aufwiesen, sind vor Ende des Langzeitversuches gestorben.

Aus den von mir durchgeführten Langzeitversuchen läßt sich kein sicherer Hinweis ableiten, daß der Grad des Kernikterus der Gunn-Ratten durch die Riboflavin-Injektionen verringert wurde. Bei den histochemischen Untersuchungen der Ganglienzellen des Kleinhirns war eine deutliche Schutzwirkung der blauen und eine weniger ausgeprägte der weißen Bestrahlung erkennbar. Hingegen ergab sich keine sichere Differenz zwischen mit Ribofl.-5'-p Na oder NaCl-Lösung behandelten Tieren in den einzelnen Gruppen.
WIRJADI hatte festgestellt, daß nach einmaliger subcutaner Injektion von 10mg/kg Ribofl.-5'-p Na bei den jungen Gunn-Ratten eine Beschleunigung der Photooxydation des Bilirubins gerade faßbar wurde. 30 Minuten nach Injektion von 100 mg/kg war die Serumbilirubinkonzentration (bezogen auf den Ausgangswert) unter weißem Licht um ca. 20 % stärker abgefallen als bei gleichartiger Bestrahlung allein. Nach 200 mg/kg betrug diese Differenz ca. 25 %. Bei blauer Bestrahlung ergab sich nach 100 mg/kg ein Unterschied von ca. 40 % und nach 200 mg/kg von ca. 50 %.

Drei Stunden nach der Injektion von 10 und 50 mg/kg stieg die Serumbilirubinkonzentration unter weißem Licht wieder etwas an, während sie nach 200 mg/kg noch weiter abfiel. Unter blauem Licht kam es nach allen getesteten Dosen zu einem mäßigen weiteren Abfall zwischen 30 Minuten und 3 Stunden.

Nach 24 Stunden war bei weißer Bestrahlung nach Injektion aller Riboflavindosen der Ausgangswert wieder erreicht bzw. überschritten. Offenbar reichte die angewendete niedrige Bestrahlungsstärke nicht aus, den altersphysiologischen Bilirubinanstieg abzufangen.
Bei blauer Bestrahlung lag der 24-Stunden-Wert bei allen Tieren (auch bei Kontrolltieren ohne Riboflavin) unter-

halb des Ausgangswertes.
Die Differenz zwischen den Kontrolltieren und denjenigen, die 200 mg/kg Riboflavin erhalten, betrug jetzt noch ca. 2o %.
Die Halbwertzeit des Riboflavinphosphates wird von LANG bei der Ratte mit 26 Minuten angegeben.

In meinen Langzeitversuchen erhielten die Tiere des Flavin bzw. NaCl-Lösung alle 48 Stunden. Jeweils vor der neuen Injektion - also 48 Stunden nach der vorangegangenen - sind die Serumbilirubinbestimmungen vorgenommen worden. Es ist anzunehmen, daß zu dieser Zeit kein Riboflavin mehr im Organismus der Ratten vorhanden war.
In den ersten Stunden nach der Injektion dürften die Ergebnisse von WIRJADI auch für die Ratten zu Beginn meiner Langzeitversuche zutreffen.
Bei den mit weißem Licht bestrahlten Tieren muß es nach mehreren Riboflavininjektionen aber zu einer so starken Beschleunigung der Photooxydation des Bilirubins gekommen sein, daß die Serumbilirubinkonzentration auch noch 48 Stunden nach der Flavingabe niedriger ist als bei den mit NaCl-Lösung behandelten Tieren (Abb. 3). Das gleiche trifft auf die sogenannten Dunkeltiere zu, die täglich mehrmals für kurze Zeit normale Raumbeleuchtung erreichte. Nach der 4. Lebenswoche schwächt sich diese Differenz wieder ab. Das stimmt mit den oben zitierten Beobachtungen von LIETZ überein, daß die gleiche Dosis Riboflavin bei 1 Monat alten Ratten den Bilirubinabbau während der Phototherapie wesentlich weniger stark beeinflußt als bei jungen Ratten. Bei blauer Bestrahlung kommt die Riboflavinwirkung in den Langzeitversuchen offenbar kaum zum Tragen, da die angewendeten hohen effektiven Bestrahlungsstärken bereits allein eine starke Verminderung des Bilirubins herbeiführen.

Berücksichtigt man die bei den Gunn-Ratten erhobenen Befunde, so kann man zum Schluß kommen, daß auch bei neugeborenen Menschen relativ hohe Dosen von Ribofl.-5'-p Na notwendig sein dürften, um eine lohnende Beschleunigung der Photodegradation des Bilirubins herbeizuführen.
Wenn derartig große Mengen Ribofl.-5'-p Na gegeben werden, muß auch bei Menschen mit (wahrscheinlich reversiblen) Hautveränderungen gerechnet werden. Da bei den Gunn-Ratten bei sehr intensiver Bestrahlung und hohen Riboflavingaben neben Hautreaktionen eine hohe Letalität auffiel, sind auch beim Menschen weitere Störungen zu befürchten. Dies muß bei einer klinischen Prüfung bedacht werden. Sicherlich sollten dabei primär wesentlich niedrigere Dosen von Ribofl.-5'-p Na verwendet werden als bei den Tierversuchen.
Außerdem erscheint Vorsicht geboten bei Verwendung von intensivem blauen Licht. Bis weitere Erfahrungen vorliegen, sollte wohl nur mit weißem Licht bestrahlt werden, wenn Riboflavin verabreicht wird.

Zusammenfassung

Durch die Injektion von Riboflavin-5'-p Na wird nach den Untersuchungen von KOSTENBAUDER und Mitarbeitern sowie von WIRJADI und LIETZ der Abfall der Serumbilirubinkonzentration während einer Phototherapie bei ikterischen Gunn-Ratten beschleunigt. Man könnte erwarten, daß eine so erzielte raschere Photodegradation des Bilirubins der Entwicklung einer Bilirubinencephalopathie (eines Kernikterus) besonders verläßlich entgegenwirkt. Aber WIRJADI hatte bereits festgestellt, daß es nach hohen Riboflavindosen bei intensiver Blaulichtbestrahlung zu erhöhter Letalität der Gunn-Ratten kam.

In der vorliegenden Arbeit wurden
erstens 3 - 5 Tage alte Gunn-Ratten mit Riboflavin-5'-p Na behandelt und unmittelbar danach mit blauem oder weißem Licht bestrahlt. Kontrollgruppen wurden im Dunkeln gehalten. Es sollte in erster Linie nach möglichen phototoxischen Reaktionen an der Haut gefahndet werden. Nach der Injektion von 200 mg/kg Riboflavin-5'-p Na (der höchsten getesteten Dosis) traten nach 12- bis 24-stündiger Bestrahlung mit blauem Licht mikroskopisch wahrnehmbare Veränderungen an der Bauch- und Rückenhaut auf. Es handelte sich um Zellödeme in der Epidermis, verstärkt positive PAS-Reaktionen und Kernpyknosen. Die Intensität nahm rasch ab, wenn geringere Dosen Riboflavin (100 oder 50 mg/kg) injiziert wurden.
Diese Hautveränderungen traten in gleicher Weise bei ikterischen homozygoten und bei nicht ikterischen heterozygoten Gunn-Ratten auf.

Zweitens wurden Langzeitversuche durchgeführt, bei denen den Tieren alle 48 Stunden Riboflavin injiziert wurde.

Hierbei verstärkten sich die Erscheinungen an der Haut nicht - im Gegenteil nach 13 bis 28 Injektionen und kontinuierlicher Bestrahlung waren keine Hautveränderungen mehr erkennbar. Jedoch traten bei 2 von 10 Tieren, die mit 100 mg/kg Riboflavin-5'-p Na behandelt und blau bestrahlt wurden, Nekrosen am Schwanz und an den Pfoten auf. Beide Tiere sind vor Versuchsende gestorben.
Die Befunde entsprechen Beobachtungen von WULF über die Manifestation phototoxischer Reaktionen in Gegenwart von Sensibilisatoren.

Am Ende der Langzeitversuche wurde das Gehirn der Tiere entnommen und histochemisch die Beschaffenheit der Purkinjezellen des Kleinhirns beurteilt. An den Purkinjezellen läßt sich eine Bilirubinencephalopathie besonders gut erfassen. Die Ergebnisse der Ganglienzelluntersuchungen erbrachten keine signifikanten Hinweise für eine Verringerung des Kernikterusgrades durch die Riboflavininjektionen.

Auch in meinen Versuchen fiel eine erhöhte Letalität derjenigen Versuchstiere auf, die hohe Riboflavindosen erhielten und einer hohen Bestrahlungsintensität ausgesetzt waren.

Die in den Tierversuchen erhobenen Befunde mahnen zur Vorsicht bei der gleichzeitigen Anwendung von Riboflavin und Phototherapie bei Neugeborenengelbsucht.

LITERATURVERZEICHNIS

BAER, R.L. — Klinische u. Immunologische Untersuchungen über Lichtallergie. Hautarzt 19, 82-86 (1968)

BALLOWITZ,L — Hyperbilirubinämie bei Neu- und Frühgeborenen. Pädiat.Praxis 13 (1973/74), 213 - 230

BALLOWITZ, L., GEUTLER, G., KROCHMANN, J., PANNITSCHKA, R., ROEMER, G., ROEMER, I. — Phototherapie in Gunn rats. Biol. Neonate 31, 229-244 (1977)

BARKA, T., P.J. ANDERSON — Histochemistry. Hoeber Medical Division, New York - Evanston - London 1965

CREMER, R.J., P.W. PERRYMAN, D.H. RICHARDS — Influence of ligt on the hyperbilirubinaemia of infant. Lancet I (1958), 1094 - 1097

HAMPEL, C. — Die Wirkung verschiedener Leuchstofflampen auf das Serumbilirubin in vivo und in vitro. Inaug. Diss FUB (1975)

HANEFELD, F.,
J. NATZSCHKA

Histochemical studies in infant Gunn rats with kernicterus.
Neuopäd. 4 (1971) 428

JOHNSON, L.,
SARMIENTO, F.,
BLANC, W.A.,
DAY, E.

Kernicterus in Rats with an Inherited Deficiency of Glucuronyl Transferase
Amer. J. Dis. Child.97: 591-608, 1959

KOSTENBAUDER, H.B.,
SANVORDEKER, D.R.

Riboflavin enhancement of bilirubin photocatabolism in vivo.
Experientia 29, 282-283 (1973)

LANG, K.

Riboflavin
Biochemie der Ernährung
Dr. Dietrich Steinkopff
Verlag-Darmstadt 1970
(s. 498-509)

LECHTKEN, P.

Singulett - Sauerstoff
chemie in unserer Zeit/8.jahrg.
1974/Nr. 1 s. 11-16

LIETZ, L.

Beschleunigung der Fotodestruktion des Bilirubins durch Riboflavin-Untersuchungen an Gunn Ratten nach verschiedenartiger Flavinzufuhr und differenter Bestrahlungsstärke.
Inaug. Diss. FU Berlin in preparation

MIESCHER, G.
Biologie und Pathologie des sichtbaren Lichtes des ultraviolet und des Infrarot. Handbuch der Allgemeinen Pathologie, Bd. X/1 hrsg. von F. Bücher u.a. Springer Verlag Berlin 1960 (s. 288)

MIESCHER, G.
Zur Histologie der lichtbedingten Reaktionen Dermatologica.Vol. 115 No. 3 (1957) s. 345-357

PASCALE, J. A., MIMS, L. C., GREENBERG, M. H., GOODEN, D.S., CHRONISTER, E.
Riboflavin and bilirubin response during phototherapy Pediat. Res. 10, 854-856 (1976)

SANVORDEKER, D.R., KOSTENBAUDER, H.B.
Mechanism of riboflavin enhancement of bilirubin. Photodecomposition in vitro. J.Pharmacol. Sci. 63, 404-408 (1974)

SCHELLONG, G., WENDE, V.
Mikromethode zur Bestimmung des Serumbilirubins aus Kapillarblut bei Neugeborenen. Arch.Kinderheil. 162, 126 (1960)

SCHENK, G.O.
Carcerogene Kohlenwasserstoffe als Photosensibilisatoren. (Zum Problem Phototoxischer Wirkungen)
Naturwiss.43 Heft 4 / 43 s.71

SCHULZ, K.H., A. WISKEMANN, K. WULF
Klinische u. exp.Unters.über die photodynamische Wirksamkeit von Phenothiazinderivaten, insbes. von Megaphen
Arch.klin.exp.Dermat.262, 285-298 (1956)

STORK, H.
Photosensibilisierung
Allergie - Theorie und Praxis
Verlag Hans Huber Bern Stuttgart Wien
s. 205

WIRJADI, D.
Der Einfluss von Riboflavin auf den Effekt der Fototherapie bei jungen Gunn Ratten.
Inaug. Diss. FU Berlin in preparation

WULF, K.
Photodynamisch ausgelöste Lichtdermatose.
Dermatologie und Venerologie
hrsg. von H.A. Gottron und W. Schönfeld
Bd III / 1
Georgr.Thieme Verlag Stuttgart
1959 (s. 110 - 112)

Frau Prof. Dr. med. L. Ballowitz möchte ich sehr herzlich danken für die Überlassung des Themas und die Anleitung, sowie für die Durchsicht der Arbeit.
Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. G. Stüttgen und Prof. Dr. H. Schaefer. Sie haben mich in die histologische Beurteilung der Rattenhaut eingewiesen. Fräulein Famula hat mir bei der Anfertigung der histologischen Präparate geholfen.
Herrn Prof. Dr. F. Hanefeld bin ich für die histochemischen Untersuchungen der Kleinhirnschnitte zu großem Dank verpflichtet und für die Beurteilung der Spektralanalysen Herrn Prof. Dr. E. Mönch.
Bei der Handhabung der Versuchstiere waren mir die medizinisch-technischen Assistentinnen Frau E. Goitia und Frau H. v. Rheden sowie die Tierpfleger Frau R. Ludwig und Herr A. Dinzel behilflich.

Lebenslauf

Am 20. April 1944 wurde ich als Sohn des Kaufmannes Oey Tjeng Hoat und seiner Ehefrau Sauw Lian, geb. Lauw in Djakarta (Indonesien) geboren.
Von 1959 bis 1962 besuchte ich die Mittelschule, danach von 1962 bis 1965 besuchte ich die 3-jährige Oberschule in Djakarta, im 2. Schuljahr der Oberschule wählte ich den Naturwissenschaftlichen Zweig.
Die Abschlußprüfung habe ich im Jahre 1965 bestanden.
Ich studierte von 1965 bis 1969 an der "Tarumanegara" Universität Djakarta und von 1971 bis 1976 an der Freien Universität Berlin.
Im April 1973 bestand ich die Ärztliche Vorprüfung und beendete mein Medizinstudium mit dem Staatsexamen im Oktober 1976 in Berlin.
Zur Zeit arbeite ich als Medizinalassistent im Kreiskrankenhaus Alfeld (Leine) auf der Chirurgischen Abteilung.